原 著

Chlorhexidine の洗口によるヒト混合唾液中
Sialic acid 量の変動について

金 森 誠 二

日本大学歯学部歯周病学教室

(指導: 楠 正夫 教授)

(昭和50年12月24日受付)

A Variation of Sialic Acid Content in Human Mixing Saliva
by Mouthrinses with Chlorhexidine Solution

Seiji KANAMORI

Department of Periodontology,

Nihon University Graduate School of Dentistry

(Director: Prof. Masao KUSUNOKI)

The mouthrinses be carried out for prevention and inhibition of periodontal diseases and dental caries. Clinical studies have shown that mouthrinses with 0.2 per cent solution of Chlorhexidine prevent the formation of dental plaque (Löe and Schiött). This clear preventive effect of dental plaque formation considered that Chlorhexidine had strong bactericidal action and antibacterial durability.

The purpose of the present study was to compare to what contents the sialic acid of human mixing saliva were influenced by Chlorhexidine and each mouth-washes be on the market (Acrinol, Oradol and Lavis).

The author carried out the experiments as follows: In vitro, variations of sialic acid contents were compared to influence in cases that 0.2 per cent solution of Chlorhexidine and other mouth-washes be on the market which were annexed to human mixing saliva and then collected from the subjects.

In vivo, it observed that the variations of sialic acid contents at interval of an hour from 8: 30a. m. to 5: 30p. m. by mouthrinses with 0.2 per cent solution of Chlorhexidine after taking regular meal.

Forty males dental student, 19 to 24 years of age included in these investigations.

Quantitative analysis of sialic acid contents was colourimetric determination by Aminoff's method.

The following conclusions are to be drawn.

1. In vitro, sialic acid decreased in saliva after 0.2 per cent of Chlorhexidine used that was more than other mouth-washes be on the market.
2. In vivo, sialic acid contents indicated considerable decrease in which mouthrinses with 0.2 per cent solution of Chlorhexidine after taking regular meal, but this value retrieved about one hour.
3. From the above, Chlorhexidine used for salivary mucin reduction, is due to effectiveness in inhibiting of dental plaque formation. The continuous usage was advised because the effective duration is limited.

第1章 緒 言

Cawson ら¹⁾が Chlorhexidine (以下 CHL と略す)

を口腔粘膜の消毒薬として初めて報告して以来, Löe ら^{2,3,4)}が 0.2% CHL による含嗽が口腔細菌の減少, 歯の表面での細菌の集落ないし歯垢形成を抑制することを発表し, その後, 歯磨剤への添加⁵⁾, 歯への局所塗布^{2,3,6)},

含嗽による菌垢および菌石形成抑制効果^{3,7)}、歯肉炎²⁾や齲蝕の発生⁸⁾を抑制する報告がなされている。

CHL の顕著な菌垢形成抑制効果は、その強い殺菌作用と、短時間の含嗽による持続的に抗菌性を発揮する点に特徴があるとされている^{4,9,10)}。しかし CHL の菌垢形成抑制作用が殺菌作用のみによるものか否かは、研究報告がすくない。そこで著者は 0.2% CHL および各種市販されている洗口剤の in vitro および in vivo における 0.2% CHL 洗口後の唾液中 mucin の構成成分である sialic acid 量の変動を比較検討し、興味ある知見を得たので報告する。

第2章 材料および方法

第1節 材料

第1項 sialic acid 定量用試薬

- 1) 25 mM 過ヨード酸 (0.125 N 硫酸溶解)
- 2) 2% 亜砷酸ソーダ (0.5 N 塩酸に溶解)
- 3) 0.1 M 2・チオバルビツール酸 (蒸留水に溶解, pH 9)

- 4) ノルマルブタノール塩酸溶液 (10.75 N 塩酸を 5% 含有)

第2項 洗口剤

- 1) 0.2% Chlorhexidine 水溶液 (20% Chlorhexidine を精製水で希釈, 住友化学工業株式会社製)
- 2) 0.001% Acrinol 水溶液 (三共製薬株式会社製)
- 3) 1% Oradol 水溶液 (武田薬品工業株式会社製)
- 4) 25% Lavis 水溶液 (日本ヴィックス株式会社製)

第3項 混合唾液

歯周疾患を有しない男子 19 才から 24 才までの本学部学生 40 名から混合唾液 (以下唾液とする) を採取し用いた。唾液の採取方法はそれを統一する意味であらかじめ一定の条件を定め、本実験を行った。

第2節 実験方法

第1項 sialic acid の比色定量法

試料を図 1 に示すごとく, aminoff 法¹¹⁾で sialic acid を比色定量した。比色には光电比色計日立 101 型を用い, 549 nm の波長で測定した。sialic acid の検量曲線は図 2 に示すごとくである。

第2項 in vitro における実験

A) 採取した唾液を 0.5 ml ずつ 5 本の試験管に分

本論文の要旨は昭和 50 年 10 月, 第 18 回日本歯周病学会総会に於て発表した。

SAMPLE 0.5 ML
- H₂SO₄ (0.125N) 1.0 ML
MIX.
INCUBATION 60 MIN. 80°C
COOLED 5 MIN.
- 2% NaAsO₂ 0.2 ML
MIX.
SHAKE
- 0.1 M C₄H₉N₂O₂S 2.0 ML
INCUBATION 7.5 MIN. 100°C
COOLED 5 MIN.
- N-BUTANOL 5.0 ML
MIX.
SHAKE
CENTRIFUGE AT 600×g FOR 10 MIN.
BUTANOL LAYER
READ IN SPECTROPHOTOMETER AT 549 nm

図 1 Aminoff 法による Sialic acid の比色定量法

図 2 シアル酸の検量曲線

表 1 混合唾液に 0.2% CHL および各種市販洗口剤を添加した場合の上清中の sialic acid 量の比較

N	Control	Saliva Annexing 0.2% CHL	Salive Annexing 0.001% Acrinol	Saliva Annexing 25% Lavoris	Saliva Annexing 1% Oradol
1	7.3	5.1	6.8	7.2	7.2
2	11.3	9.0	11.0	10.2	9.8
3	8.2	6.5	7.9	8.3	8.1
4	5.7	4.9	5.5	6.0	5.3
5	6.7	5.7	6.8	6.8	6.4
6	8.5	7.1	8.8	8.1	8.6
7	9.5	7.4	9.1	8.7	8.6
8	11.0	9.1	10.2	10.6	9.5
9	9.7	7.5	9.5	9.5	9.1
10	7.4	5.9	7.6	7.1	7.4
M.	8.5	6.8	8.3	8.2	8.0
S. D.	1.8	1.4	1.7	1.5	1.4

け、対照には 0.5 ml の蒸留水、各々の試験管に洗口剤、すなわち 0.2% CHL, 0.001% Acrinol 水溶液、25% Lavoris 水溶液および 1% Oradol 水溶液を 0.5 ml 入れ、1 分間軽く攪拌後、10 分間 600×g にて遠心分離し上清を試料として sialic acid を定量した。

B) 採取した唾液を 0.5 ml ずつ試験管に入れ、同量の上述した各種洗口剤を添加攪拌し、37°C で 0 分間、2 分間、4 分間、6 分間、8 分間および 10 分間それぞれインキュベートしたのち 10 分間 600×g にて遠心分離し、上清を試料とした。

第3項 in vivo における実験

A) 1 日（午前 8 時 30 分から 17 時 30 分）における sialic acid の経時的変動

午前 8 時 30 分から 17 時 30 分までの 1 時間毎に安静無刺激の唾液約 3 ml を採取し、0.5 ml ずつ 4 本の試験管に分け、ただちに 10 分間 600×g にて遠心分離し、上清を試料とした。

B) 午前 8 時 30 分、12 時 30 分および 16 時 30 分の食事摂取後、B-1 群は洗口を行わず、B-2 群は蒸留水、B-3 群は 0.2% CHL 各 10 ml で洗口し、それぞれ唾液を約 3 ml 採取して A) と同様の方法で処理し試料とした。

第 3 章 成 績

第 1 節 in vitro における sialic acid 量への影響

0.2% CHL および各種市販洗口剤添加唾液中の sialic

図 3 in vitro における 0.2% CHL と各種市販洗口剤との唾液上清中 sialic acid 量の比較

acid 量を測定した結果は表 1 に示すごとくである。本実験で用いた 0.2% CHL は sialic acid の発色を妨害して 60% down する。この表の値はこの妨害を考慮して補正した値である。

次に 0.2% CHL および各種洗口剤添加唾液中の sialic acid 量の時間的変動を測定した結果は図 3 に示すごとくである。対照群が殆んど変化しないのに対し、0.2% CHL 添加した場合の唾液中 sialic acid 量のみ減少した。

第 2 節 in vivo における sialic acid 量への影響

表 2 午前8時30分から17時20分までの1時間毎の安静無刺激の混合唾液中 sialic acid 量の経時的変動

TIME N	8:30	9:30	10:30	11:30	12:30	13:30	14:30	15:30	16:30	17:30
1	8.7	9.5	10.9	12.6	13.5	8.5	12.6	8.7	8.3	7.9
2	10.2	13.9	13.1	13.8	13.9	14.1	13.9	12.8	10.1	10.2
3	7.6	8.6	9.5	9.3	9.8	7.0	7.8	7.8	7.4	6.8
4	8.9	6.3	6.5	5.7	6.6	4.9	5.5	4.6	4.4	5.5
5	7.6	7.8	6.9	8.3	9.3	7.5	7.2	7.1	6.9	6.9
6	7.8	7.4	7.9	8.0	8.5	7.7	6.4	6.3	7.1	7.2
7	7.4	6.3	7.6	8.5	8.6	6.6	5.9	6.6	6.6	6.6
8	8.0	8.1	7.7	7.7	8.9	8.9	6.9	6.9	6.6	6.4
9	10.2	12.5	11.7	11.1	12.1	10.2	7.2	7.1	7.1	7.3
10	6.2	6.2	6.9	7.6	7.9	6.3	6.6	6.7	6.6	5.7
M.	8.2	8.6	8.8	9.2	9.8	8.1	8.0	7.4	7.1	7.0
S. D.	1.2	2.6	2.3	2.4	2.4	2.5	2.8	2.1	1.4	1.3

(μg/ml)

表 3 各食事後、洗口しない場合の唾液中 sialic acid 量の経時的変動

TIME N	8:30	8:35	9:30	10:30	11:30	12:30	12:35	13:30	14:30	15:30	16:30	16:35	17:30
1	9.1	10.2	10.9	10.0	10.1	10.6	10.8	10.5	10.2	8.9	9.7	10.1	8.7
2	7.0	7.8	7.6	7.8	8.1	9.2	8.8	7.4	7.1	6.2	7.1	7.5	6.4
3	8.9	9.3	8.6	8.9	9.2	9.1	10.0	8.1	8.6	7.1	6.2	8.2	7.2
4	5.7	6.5	6.4	6.8	7.1	7.2	7.8	6.7	7.4	6.9	6.7	6.5	6.5
5	7.1	7.2	7.4	7.0	9.1	7.4	9.1	8.4	6.5	7.4	7.2	7.4	7.1
M.	7.5	8.1	8.1	8.1	8.7	8.7	9.3	8.2	7.9	7.3	7.3	7.9	7.1
S. D.	1.4	1.5	1.7	1.3	1.1	1.4	1.1	1.4	1.4	0.9	1.3	1.3	0.9

(μg/ml)

本節では in vivo における CHL の sialic acid 量に与える影響を調べた。

第1項 1日（午前8時30分から17時30分）における sialic acid 量の経時的変動

午前8時30分から17時30分までの1時間毎の安静無刺激の唾液中 sialic acid 量が経時的にどのように変動するかを測定した結果は、表2に示すごとくである。午前8時30分から17時30分の測定時間で最高値は午後12時30分であり、午前の方が午後より高い値を示す傾向が認められた。

第2項 食事摂取後洗口しない場合の sialic acid 量の経時的変動

各食事後、洗口しない場合の唾液中 sialic acid 量の経時的変動を測定した結果は表3に示すごとく、それぞ

れ食事後わずかに増量を示した。

第3項 食事摂取後蒸留水で洗口した場合の sialic acid 量の経時的変動

各食事後、対照として蒸留水 10 ml 1分間洗口、洗口5分後の唾液中 sialic acid 量の経時的変動を測定した結果は表4に示すごとく、それぞれわずかな減少が認められた。

第4項 食事摂取後 0.2% CHL で洗口した場合の sialic acid 量の経時的変動

各食事後、0.2% CHL 10 ml 1分間洗口し洗口5分後の唾液中 sialic acid 量の経時的変動を測定した結果は表5に示すごとく、食事5分後にそれぞれ著明な減少が認められた。また各群とも午後12時30分に最高値を示した。以上の結果から 0.2% CHL を用いた洗口だけ

表 4 各食事後、蒸留水 10 ml で1分間洗口、洗口5分後の唾液中 sialic acid 量の経時的変動

TIME N	8:30	8:35	9:35	10:30	11:30	12:30	12:35	13:30	14:30	15:30	16:30	16:35	17:30
1	7.2	6.5	7.7	8.3	8.3	8.8	6.4	7.5	7.4	7.5	7.1	6.7	7.9
2	8.4	7.4	8.4	8.2	7.4	8.5	8.0	9.4	8.2	8.1	7.9	6.7	7.8
3	9.8	9.4	10.0	11.2	10.7	13.5	11.0	10.2	9.4	10.6	9.4	9.0	8.3
4	6.5	5.5	6.4	6.9	7.2	8.0	7.2	8.0	6.7	6.0	7.4	6.0	6.8
5	6.8	6.6	7.1	7.2	6.6	8.9	8.7	8.4	7.4	7.0	5.8	5.7	6.0
M.	7.7	7.0	7.9	8.3	8.0	9.5	8.2	8.7	7.8	7.8	7.5	6.8	7.3
S.D.	1.3	1.4	1.3	1.7	1.6	2.2	1.7	1.0	1.0	1.7	1.3	1.2	0.9

($\mu\text{g/ml}$)

表 5 各食事後、0.2% CHL 10 ml で1分間洗口、洗口5分後の唾液中 sialic acid 量の経時的変動

TIME N	8:30	8:35	9:30	10:30	11:30	12:30	12:35	13:30	14:30	15:30	16:30	16:35	17:30
1	6.7	3.6	8.3	8.6	8.3	9.2	6.6	8.6	8.4	8.3	6.3	5.8	6.0
2	6.2	3.0	6.3	6.4	7.2	8.6	5.5	7.0	6.4	6.7	7.1	3.3	7.6
3	7.9	4.9	6.8	6.8	7.4	7.9	5.0	6.7	7.4	7.4	6.4	4.8	6.4
4	8.6	3.8	7.7	7.6	7.7	8.5	5.7	8.3	7.8	7.3	6.0	3.6	7.1
5	7.5	5.4	8.5	8.3	9.1	9.1	6.3	6.8	7.1	6.5	5.3	3.8	5.3
6	9.2	4.4	8.9	9.1	9.3	9.1	8.3	9.2	8.5	7.2	7.6	5.1	8.3
7	6.3	2.9	7.9	8.1	8.5	8.7	5.0	7.1	6.3	6.0	6.9	5.2	6.8
8	11.7	4.5	10.6	11.6	11.5	12.5	4.7	9.8	10.5	10.5	10.0	5.7	9.1
9	6.8	4.3	7.6	6.8	7.2	8.3	5.3	6.3	6.3	6.9	6.5	3.8	6.0
10	7.6	4.3	7.9	7.9	8.1	9.3	6.0	7.8	7.8	7.7	7.4	4.9	7.1
M.	7.8	4.1	8.0	8.1	8.4	9.1	5.8	7.7	7.6	7.4	6.9	4.6	6.9
S.D.	1.6	0.7	1.1	1.4	1.3	1.2	1.0	1.1	1.2	1.2	1.2	0.9	1.1

($\mu\text{g/ml}$)

が唾液中 sialic acid 量の減少を認める結果を得た。

第4章 検 討

CHL の歯垢形成抑制剤としての効果について、Kor-nman ら⁸⁾および Flotra ら¹²⁾は抗菌性以外の要因が関与する可能性を指摘しており、近年 CHL における歯垢、歯石形成抑制の作用機序について、Hjeljord¹³⁾ は CHL 洗口後、CHL が唾液中の蛋白質を沈澱させ、また Le⁹⁾ はエナメル質中の hydroxapatite とに吸着し、その持続性の殺菌作用で歯面上への細菌類の付着を抑制して、歯垢形成の基礎となる細菌層の形成を阻止するものと考えた。さらに竹村¹⁴⁾は CHL による歯面に付着した菌体外多糖体も溶化すると述べている。そこで著

者は歯垢形成抑制につき、0.2% CHL および従来より市販されている洗口剤における唾液中の sialic acid の変動を検討した。

三代^{15,16)}は分泌される唾液中の sialic acid 量は全て mucin と結合した Sialomucoid の形で分泌されると報告している。そこで sialic acid を測定することにより mucin を間接的に測定できる。そこで実験の第1として in vitro において唾液に 0.2% CHL および各種市販洗口剤を添加し反応させた結果、0.2% CHL を添加直後の唾液中 sialic acid 量は平均 1.6 $\mu\text{g/ml}$ の減少を示したのに対し、他の市販洗口剤添加唾液中 sialic acid 量は平均 0.3 $\mu\text{g/ml}$ の減少で両者の差は大きく、その理由は CHL と唾液中の mucin が結合することによるのかもしれない。唾液に CHL および他の洗口剤を

添加した場合の sialic acid 量の時間的変動を測定した結果では、蒸留水, Lavoris および Oradol 添加唾液ではわずかに増加したのに対し、Acrinol および CHL 添加唾液中 sialic acid 量では減少を示し、特に CHL 添加2分後に著明な減少を認めた。CHL が添加直後にその作用を開始するものと思われる。in vitro の成績より Acrinol, Lavoris および Oradol 添加唾液中には、sialic acid 量の著明な変化が認められなかったので in vivo において以後 CHL のみ実験をおこなった。午前8時30分より17時30分までの1時間毎の sialic acid 量の変動を検討してみたところ、有意差はないが午前の方が午後より高い値が得られた。この理由について著者の実験の範囲では不明である。蒸留水で食事後洗口した時の sialic acid 量は、毎洗口後とも減少が認められるが、0.2% CHL で洗口した時と比較し、減少量がすくない。0.2% CHL 洗口後著明な sialic acid 量が減少するが、1時間後には蒸留水で洗口した時と同じ量にもどる傾向を示した。Löe³⁾ らの CHL の0.2% 液による洗口および2% 液の塗布を行った結果、結論的には毎日使用する必要があることを報告している。要するに、CHL は唾液の mucin の減少に何らかの作用を及ぼし、その結果として歯垢の形成を抑制する効果があるが、その持続時間は限られているので継続的な使用が望まれる。しかし CHL が歯垢形成抑制効果のあることは、Löeをはじめ多くの報告^{2,3,5,7,9,12,13,14,17)} であきらかである。

第5章 結 論

0.2% CHL および各種市販されている洗口剤の in vitro および in vivo における0.2% CHL の洗口後の唾液中 mucin の構成成分である量 sialic acid の変動を比較検討した結果、次のごとき結論を得た。

1. in vitro において0.2% CHL は他の市販洗口剤より、唾液中 sialic acid を減少させる効力はすぐれており、さらに使用直後にその作用は認められた。

2. in vivo において食事後0.2% CHL 洗口後に sialic acid 量が著明な減少を示したが、約1時間にして元の値に復した。

3. 以上のことから CHL は唾液の mucin の減少に何らかの作用を及ぼし、その結果として歯垢の形成を抑制する効果があるが、その持続時間は限られているので継続的な使用が望まれる。

稿を終るにのぞみ、終始御指導と御校閲を賜った楠

正夫教授に深厚なる感謝の意を表します。また本研究に種々の御教示を賜った鈴木貫太郎教授および村井正大助教授に謝意を表わすとともに、歯周病学教室各位の御協力に感謝いたします。

文 献

- 1) Cawson, R.A. & Curson, I. : The Effectiveness of Some Antiseptics on the Oral Mucous Membrane; Br. dent. J., 106 : 208-211, 1959.
- 2) Löe, H. & Schiött, R. : The Effect of Mouthrinses and Topical Application of Chlorhexidine on the Development of Dental Plaque and Gingivitis in Man; J. Periodont. Res., 5 : 79-83, 1970.
- 3) Löe, H., Mandell, M., Derry, A. & Schiött, R. : The Effect of Mouthrinses and Topical Application of Chlorhexidine on Calculus Formation in Man; J. Periodont. Res., 6 : 314-317, 1971.
- 4) Schiött, R., Löe, H., Jensen, B., Kilian, N., Davies, M. & Glavino, K. : The Effect of Chlorhexidine Mouthrinses on the Human Oral Flora; J. Periodont. Res., 5 : 84-89, 1970.
- 5) Harrap, G.J. : Assessment of the Effect of Dentifrices on the Growth of Dental Plaque; Journal of Periodontology, 1 : 166-174, 1974.
- 6) 有田正俊, 山田 茂, 堀内敦彦, 今井香樹, 梅沢富嶽, 永田 温, 広田幹哉 : Chlorhexidine による歯垢生成抑制効果に関する研究 : 日大歯学, 46 : 10-14, 1972.
- 7) Turesky, S., Soloway, B., Warner, V. & Mirth, D. : Prolonged Inhibition of in Vitro Plaque Formation by Chlorhexidine Gluconate; J. Perio., 45 : 558-560, 1974.
- 8) Kornman, K.S., Clark, W.B., Kreitzman, S. N. & Alvarez, C. : Caries Control in the Albino Rat with Chlorhexidine Gluconate (HIBITANE); Archs Oral Biol., 18 : 165-170, 1973.
- 9) Rølla, G., Löe, H. & Schiött, R. : The Affinity of Chlorhexidine for Hydroxyapatite and

- Salivary Mucins; J. Periodont. Res., 5: 90-95, 1970.
- 10) Løe, H.: Does Chlorhexidine have a Place in the Prophylaxis of Dental Diseases? "Metabolism"; J. Periodont. Res. Suppl. 12: 95-96, 1973.
 - 11) Aminoff, D.: Methods for the Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids; Biochem. J., 81: 384-392, 1961.
 - 12) Flotra, L., Gjermo, P., Rølla, G. & Waerhaug, J.: Side Effects of Chlorhexidine Mouth Washes; Scand. J. Res., 79: 119-125, 1971.
 - 13) Hjeljord, L.G., Rølla, G. & Bonesvoll, P.: Chlorhexidine-Protein Interactions; J. Periodont. Res., 8: 57-64, 1973.
 - 14) 竹村金造: クロールヘキシジンの菌垢抑制機序の in vitro における解析: 日保歯誌, 18, (1): 35-36, 1975.
 - 15) 三代幸彦: Sialic acid について: 歯学, 50: 235-237, 1962-1963.
 - 16) 三代幸彦: シアル酸と齲蝕: 歯学, 51: 237-243, 1964.
 - 17) Boyd, R. & Løe, H.: Optimal Dosage and Method of Delivering Chlorhexidine Solution for the Inhibition of Dental Plaque; J. Periodont. Res., 8: 57-62, 1973.